中华按蚊血红素加氧酶基因 *AsHO*-1 的鉴定及其在血餐后虫体中的表达动态

支中婧，秦　赠，黄　婷，冉永红，闫振天，司风玲，陈　斌*，何正波*

（重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所，重庆 401331）

摘要：【目的】雌蚊需要吸食血液以完成营养生殖循环，血液蛋白的消化会释放大量的游离血红素。血红素是促氧化剂，必须严格调控血红素的动态平衡。血红素加氧酶（heme oxygenase, HO）在血红素的动态平衡调控中起着关键的作用，但不同昆虫 HO 代谢血红素的途径有差异。本研究旨在鉴定和表达分析中华按蚊 *Anopheles sinensis* 的 *HO*-1 基因，研究 *HO*-1 和血红素在血餐后的动态变化过程，为进一步研究中华按蚊血红素的动态平衡调控机制奠定基础。【方法】通过分析中华按蚊的转录组数据鉴定 *HO*-1 基因，采用实时定量 PCR 技术分析该基因在不同组织和在取食血液、葡萄糖前后的表达谱，并测定取食血液后中肠中不同时间的血红素浓度。【结果】鉴定到中华按蚊血红素加氧酶 1 基因，命名为 *AsHO*-1（GenBank 登录号为 KP994552）。*AsHO*-1 开放阅读框长 729 bp，编码 242 个氨基酸。定量 PCR 表达分析发现，*AsHO*-1 在幼虫和成虫的中肠和中肠外组织（仅去掉中肠的虫体）中都有表达，中肠外组织中的表达水平显著高于中肠中的表达水平。*AsHO*-1 在吸食血液后的中肠中上调明显，而在中肠外组织中的表达变化较小。吸食葡萄糖后，中肠中 *AsHO*-1 在 6-12 h 表达上升，最高上升了 4.2 倍，而在吸食血液后 *AsHO*-1 在 12-24 h 表达上升，最高上升了 11.67 倍。中肠中的血红素含量在吸食血液后的 3 h 即开始迅速上升，6 h 达到最高，18 h 开始下降。【结论】研究结果说明 *AsHO*-1 在血餐后表达水平显著上调，有可能与血红素的动态调节有关，但有待进一步验证。除中肠外，*AsHO*-1 基因还在幼虫期和在成蚊的中肠外组织中高表达，说明 *AsHO*-1 基因还可能参与中华按蚊的其他多种生理过程。

关键词：中华按蚊；血餐；血红素加氧酶-1；血红素；表达谱

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2015)09-0950-09

Molecular characterization and expression profiles post blood feeding of heme oxygenase gene *AsHO*-1 in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae)

ZHI Zhong-Jing, QIN Zeng, HUANG Ting, RAN Yong-Hong, YAN Zhen-Tian, SI Feng-Ling, CHEN Bin*, HE Zheng-Bo* (Institute of Entomology and Molecular Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: 【Aim】A blood meal is essential for the anautogenous mosquito to complete each gonotrophic cycle. The hydrolysis of blood proteins by midgut proteases results in a massive release of free heme, a known prooxidant molecule. The blood-sucking mosquitoes must strictly regulate heme homeostasis. An important component of this control is heme oxygenase (HO). The existing research results show that the heme-degradation pathway is likely to be different in different insect orders. Our study aims to clone *HO*-1 gene from *Anopheles sinensis*, analyze its expression post blood feeding to provide the foundation for further research of the molecular mechanism of heme homeostasis in *An. sinensis*. 【Methods】A transcriptome database for *An. sinensis* was mined through bioinformatic analysis. Gene expression levels were analyzed in the midgut and other body tissues except midgut (carcass) and at different time post blood feeding using real-time PCR. Meanwhile, the concentrations of heme at different time post blood feeding were measured. 【Results】A HO-1 gene was identified, and named as *AsHO*-1, with the GenBank

基金项目：国家自然科学基金项目(31572332, 31372265)；"重庆市优秀人才支持计划"和"两江学者"计划专项经费资助项目
作者简介：支中婧，女，1990 年生，重庆人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail: zhiya_happy@126.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: zhengbohe@cqnu.edu.cn; bin.chen@cqnu.edu.cn
收稿日期 Received: 2015-04-13；接受日期 Accepted: 2015-05-29

accession number of KP994552. *AsHO*-1 contains a 729 bp open reading frame encoding 242 amino acid residues. Expression analysis showed that *AsHO*-1 was simultaneously expressed in the midgut and carcass of *An. sinensis* and the expression level of *AsHO*-1 in carcass was markedly higher than that in the midgut. *AsHO*-1 mRNA levels remained elevated at 6 – 12 h after glucose feeding with a maximum 4.2-fold increase, while the expression level significantly increased at 12 – 24 h post blood feeding with a maximum 11.67-fold increase. The heme level increased significantly at 3 h post blood feeding, peaked at 6 h, and then decreased at 18 h.【Conclusion】These findings suggest that *AsHO*-1 can be induced by blood feeding, and may be involved in the regulation of heme homeostasis, although further researches need to be performed to confirm this speculation. Furthermore, *AsHO*-1 is also highly expressed at larval stage and in body tissues except midgut, suggesting that *AsHO*-1 might be involved in multiple physiological processes of *An. sinensis*.

Key words: *Anopheles sinensis*; blood meal; heme oxygenase-1; heme; expression profile

嗜血性蚊虫需要吸食脊椎动物的血液以获取必需的营养,才能完成生殖营养周期(Attardo *et al*., 2005)。这种吸血性行为使得蚊虫成为疟疾、乙型脑炎、登革热、黄热病、丝虫病等传染性疾病的传播媒介。蚊虫一次血餐的蛋白质总量约为 500 μg,其中主要是血红蛋白(约 66%)、血清白蛋白(约 10%)和免疫球蛋白(约 3%)(Isoe *et al*., 2009)。蚊虫吸血后,大量的蛋白水解酶分泌到中肠,将血液蛋白迅速降解成寡肽和氨基酸(Zhou *et al*., 2004; Isoe *et al*., 2009)。每一血红蛋白分子由 4 分子的珠蛋白和 4 分子亚铁血红素组成。随着血红蛋白的降解,迅速释放出大量的游离血红素(Pascoa *et al*., 2002; Pereira *et al*., 2007; Isoe *et al*., 2009)。游离的血红素是强有力的促氧化剂,导致活性氧族(reactive oxygen species, ROS)的形成,对生物分子造成破坏(Ryter and Tyrrell, 2000; Lima *et al*., 2012);同时,血红素还是双亲性分子,能插入磷脂双分子层,使膜结构不稳定,导致细胞破裂(Schmitt *et al*., 1993)。因此,蚊虫血餐后释放的过量血红素会对细胞产生毒性作用,必须严格调控血红素的动态平衡(Paiva-Silva *et al*., 2006)。

吸血性的节肢动物在长期的演化过程中,逐渐形成了一系列适应吸血的机制(Graça-Souza *et al*., 2006)。通过血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)(EC 1.14.99.3)来分解代谢血红素是最重要的应对血红素毒性的方式(Ortiz de Montellano and Wilks, 2000)。除此之外,长虹猎蝽 *Rhodnius prolixus* 和微小牛蜱 *Boophilus microplus* 还可通过抗氧化酶的高水平表达、血红素结合蛋白的脱毒和血红素的凝集等来控制游离血红素的动态平衡(Dansa-Petretski *et al*., 1995; Oliveira *et al*., 1999; Maya-Monteiro *et al*., 2000; Paes *et al*., 2001; Lara *et al*., 2003, 2005);埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中肠围食膜(peritrophic matrix)可以大量结合游离的血红素(Pascoa *et al*., 2002; Devenport *et al*., 2006);长虹猎蝽还可将血红素转变成疟原虫色素(hemozoin)的可溶性聚合物(Oliveira *et al*., 1999, 2002)。

HO 最先从哺乳动物中发现,是一种微粒体酶,在细菌、昆虫、藻类、植物和脊椎动物等生物中广泛存在(Richaud and Zabulon, 1997; Ortiz de Montellano and Wilks, 2000; Lecube *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2004; Paiva-Silva *et al*., 2006; Xie *et al*., 2015)。对 *HO* 基因及其功能的研究主要集中在哺乳动物和植物中,有关昆虫 HO 基因的报道较少。在哺乳动物中,HO 存在 3 种不同的亚型,即 HO-1, HO-2 和 HO-3。HO-1 为诱导型血红素氧化酶,主要在脾脏和肝脏中高表达,而 HO-2 为组成性表达,主要在脑和精巢中高表达,HO-1 和 HO-2 在哺乳动物的血红素代谢中起着重要的作用,而 HO-3 的功能还不是很清楚(McCoubrey *et al*., 1997; Zhang *et al*., 2004; Kikuchi *et al*., 2005; Liao *et al*., 2013)。在植物中只有 HO-1 和 HO-2 两个亚型(Fu *et al*., 2011),而在昆虫中也只有 HO-1 和 HO-2 两个亚型。

哺乳动物 HO 将血红素卟啉环上的 α-内消旋碳羟基化,然后通过氧依赖性的切除羟基化的 α-内消旋碳,生成胆绿素 IXα (Biliverdin IXα, BVIXα)、CO 和 Fe^{2+}(Ortiz de Montellano and Wilks, 2000)。然而长虹猎蝽的血红素代谢生成的是 Dicysteinyl-BVIXγ、CO 和 Fe^{2+}(Paiva-Silva *et al*., 2006),埃及伊蚊血红素代谢生成的产物是 Biglutaminyl-BVIXα, CO 和 Fe^{2+}(Pereira *et al*., 2007)。将黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* HO 基因进行原核表达后,能够体外降解血红素,生成 BVIXα, BVIXβ 和 BVIXδ (Zhang *et al*., 2004)。这些说明昆虫 HO 代

谢血红素的机制与哺乳动物不一样，而且不同昆虫HO代谢血红素的机制有差异，生成的产物也不一样（Zhang *et al*., 2004; Paiva-Silva *et al*., 2006; Pereira *et al*., 2007）。采用RNAi方法特异性地抑制黑腹果蝇复眼成虫盘中*HO*基因的表达，导致复眼发育畸形，说明HO除与血红素代谢有关外，还与黑腹果蝇特定组织的正常生长发育有关（Cui *et al*., 2008）。

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 是我国最重要的传疟媒介之一，雌蚊兼吸人、畜血液（Chen *et al*., 2014）。迄今为止，有关中华按蚊吸血后血红素代谢的分子机理还未见报道。本研究通过分析中华按蚊的转录组数据（Chen *et al*., 2014），鉴定到一个全长的HO基因，命名为*AsHO*-1。表达分析发现*AsHO*-1在幼虫和成蚊的中肠、中肠外组织（仅去掉中肠的虫体）中均有表达；吸血后，中华按蚊中肠中的血红素浓度迅速上升，随后中肠中*AsHO*-1的表达水平也显著上调，说明*AsHO*-1基因被血红素诱导表达，可能参与血红素的降解代谢途径。研究结果为进一步研究中华按蚊血红素的动态平衡调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

实验室品系的中华按蚊原采自江苏省宜兴市，已在室内饲养20多代。饲养条件及饲养方法见秦赠等(2014)。

1.2 主要试剂

RNeasy Micro Kit购于Qiagen公司，Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit购于Fermentas公司，TaqMix、RNA Cleanup Kit购于康为世纪公司，SYBR® Green I购于BIO-RAD公司，血红素浓度测定试剂盒（QuantiChrom™ Heme Asaay）购于美国BioAssay公司，其他均为国产分析纯试剂。

1.3 中华按蚊 *HO*-1 基因的鉴定与分析

以“heme oxygenase”为关键词搜索中华按蚊的转录组数据库（Chen *et al*., 2014）。用ORF Finder软件预测编码序列，进一步在NCBI进行TBLASTX在线比对，并与中华按蚊的基因组序列进行在线比对（Zhou *et al*., 2014）。根据序列设计特异性引物，以中华按蚊中肠的cDNA为模板进行PCR扩增，产物送上海桑尼生物科技有限公司测序。

用GENSCAN预测基因，分析内含子、外显子结构（http://genes.mit.edu/GENSCAN.html）；用pI/Mw计算理论等电点（pI）和分子量（Mw）（http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html）；用SignalP 4.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/）预测信号肽；CD-search（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）分析保守结构域；通过BLAST在NCBI数据库中找到相似序列，用Clustal X 1.83进行多序列比对（Thompson *et al*., 1997），利用MEGA4.0软件程序，运用邻近连接方法（neighbor-joining, NJ）建立系统发育树，分支节点支持率采用1 000次重复抽样进行氨基酸序列聚类分析（Tamura *et al*., 2007）。

1.4 *AsHO*-1 基因在中肠和中肠外组织中的表达

以4龄幼虫和羽化后第3天的雌、雄蚊作为实验材料。幼虫为4龄的雌、雄混合样品。将取样的蚊虫放置冰上冻晕，在解剖镜下用镊子分离消化道，再用眼科剪截取中肠，将中肠和中肠以外的组织（仅去掉中肠的虫体）分别放入RNA保存液中。取自10头蚊虫组织为一个样品，取3个重复的样品。

按照RNeasy Micro Kit（Qiagen）的说明书提取总RNA，DNase I（RNase Free）去除基因组DNA，RNA电泳与定量检测后，参照RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit（Fermentas）说明书以1 μg的总RNA为模板合成cDNA。根据*AsHO*-1的cDNA序列设计荧光定量PCR引物，以*ribosomal protein S7*（*Rps7*）基因为内参（秦赠等，2014）。定量PCR采用SYBR® Green I（Bio-Rad）染料，使用Bio-Rad的CFX Connect™荧光定量PCR仪进行。定量PCR扩增反应总体积为20 μL，包括2×SYBR® Green I 10 μL，10 μmol/L正反向引物各0.4 μL，模板cDNA 0.8 μL，超纯水8.4 μL。扩增程序为：94℃预变性2 min；94℃ 15 s，56℃ 15 s，72℃ 20 s，40个循环。重复3次。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算*AsinOBP1*基因在不同组织的表达情况（Livak and Schmittgen, 2001），以*AsHO*-1在雌成虫中肠的表达水平为基准比较*AsHO*-1基因在雌、雄蚊和4龄幼虫的中肠和中肠外组织中的差异表达情况。

1.5 *AsHO*-1 基因在血餐前后的中肠和中肠外组织中的表达

羽化后第3天的雌蚊用麻醉的小鼠喂血。将完成吸血的蚊虫吸入纸杯，记录吸血时间。分别取吸血前后3, 6, 12, 18, 24, 36和48 h的中肠和中肠外组织。重复3次。总RNA提取、cDNA制备和定量PCR方法同1.4节。以*AsHO*-1在中肠外组织中的表达水平为基准比较*AsHO*-1在吸血前后的中肠

和中肠外组织中的差异表达情况。

1.6　*AsHO*-1 基因在取食血液或葡萄糖溶液后的表达

羽化后第 3 天的雌蚊用麻醉的小鼠喂血，或只喂食 10% 的葡萄糖溶液。完成取食时开始计时，分别取进食前、进食后 3，6，12，18，24，36 和 48 h 的中肠。重复 3 次。总 RNA 提取、cDNA 制备和定量 PCR 方法同 1.4 节。以 *AsHO*-1 在吸食葡萄糖前的表达水平为基准，比较 *AsHO*-1 在吸食葡萄糖和血液前后的中肠中的差异表达情况。

1.7　吸血前后血红素浓度的测定

中华按蚊吸血前后中肠中血红素浓度的测定按照 QuantiChrom^{TM} Heme Asaay（BioAssay，USA）说明书进行，用 ELX800 酶标仪测定。分别取吸血前、吸血后 3，6，12，18，24，36 和 48 h 的中肠，每 5 头蚊虫的中肠为一个样品，放入 1.5 mL 离心管中，用研磨棒研磨，14 000 r/min 离心 5 min，取上清夜，用超纯水稀释 500 倍，即为制备好的样品溶液用于血红素浓度测定。在 96 孔板中加入 50 μL 样品溶液和 200 μL 试剂盒提供的反应液，混合均匀，室温下反应 5 min，在 400 nm 波长下测定吸光值。设置空白组和阳性对照组：用 50 μL 超纯水代替样品液，即为空白对照；用 50 μL 试剂盒提供的血红素标准品代替样品液，即为阳性对照。用以下公式计算血红素浓度：

$$C = \frac{OD_{样品} - OD_{空白对照}}{OD_{阳性对照} - OD_{空白对照}} \times 62.5 \times n(\mu mol/L)。$$

其中，$OD_{样品}$，$OD_{阳性对照}$ 和 $OD_{空白对照}$ 分别是样品、阳性对照和空白液在 400 nm 波长下的 OD 值，n 是样品稀释倍数。重复 3 次。

1.8　数据统计与分析

采用 DPS 软件对定量 PCR 结果进行数据的统计分析，统计数据以平均数 ± 标准差表示，组间差异采用单因素方差分析（one-way ANOVA）和 Turkey 检验方法，两组比较采用 Student *t*-test 进行分析。

2　结果

2.1　*AsinHO*-1 基因的鉴定和分析

用“heme oxygenase”为关键词，从中华按蚊转录组数据库中搜索到转录本拼接序列 Unigene16314_5，全长 823 bp，有完整的开放阅读框，长 729 bp，编码 242 个氨基酸（图 1）。根据 Unigene16314_5 序列设计特异引物（包含完整的开放阅读框），以中华按蚊触角的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 产物送上海桑尼生物科技有限公司测序。测序结果显示与 Unigene16314_5 序列完全一致。同源性分析发现该基因与达氏按蚊 *Anopheles darlingi* HO-1（GenBank 登录号：ETN58590）、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* HO-1（GenBank 登录号：AGAP003975-PA）、埃及伊蚊 HO-1（GenBank 登录号：XP_001658955）和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* HO-1 的氨基酸序列一致性分别为 83%，81%，65% 和 65%，表明鉴定出的基因可能为中华按蚊的 *HO*-1，将该基因命名为 *AsHO*-1，GenBank 登录号为 KP994552。

AsHO-1 的理论分子量为 28.25 kDa，理论等电点为 9.34。*AsHO*-1 基因有 1 个内含子，长 73 bp（图 1：A）。AsHO-1 N 端无信号肽序列，亚细胞定位预测显示该蛋白定位于细胞质中。蛋白质结构域分析结果表明 AsHO-1 有 1 个保守的 HemeO 结构域（第 6 – 209 位氨基酸，E = 6.46e-46），形成血红素结合口袋的 8 个氨基酸残基分别为 Arg12，Thr15，His19，His119，Gly127，Leu131，Leu171 和 Phe198（图 1：B）。

将中华按蚊 AsHO-1 与分属于昆虫、脊椎动物、藻类和植物的 HO-1 进行比对，并用 NJ 法绘制了分子系统发育树，利用自举分析（Bootstrap，1 000 次重复）检验各分支的置信度。由进化树可以发现昆虫、脊椎动物、藻类和植物的 HO-1 形成明显的4 支，AsHO-1 与达氏按蚊 HO-1（ETN58590）的亲缘关系最近（图 2），与同源性比对结果一致。

2.2　吸血前后中华按蚊中肠中血红素的浓度变化

吸血前中华按蚊中肠中的血红素含量很低，吸血后 3 h 血红素浓度迅速上升，至 6 h 达到最高，一直持续到吸血后 12 h，随后血红素浓度开始下降，直到吸血后的 48 h 血红素浓度下降到吸血前的水平。吸血后血红素浓度呈现阶段式的变化，吸血后 3 – 12 h 血红素浓度维持较高的水平，而吸血后 18 – 36 h 血红素的浓度明显下降，但又显著高于吸血前和吸血后 48 h（图 3）。

2.3　*AsHO*-1 基因在中华按蚊中肠、中肠外组织中的表达

荧光定量 PCR 结果表明 *AsHO*-1 基因在幼虫和成虫的中肠、中肠外组织中都有表达，但中肠外组织中的表达水平极显著高于中肠（$t_{雌成虫} = 12.0137$，$P = 0.0003$；$t_{雄成虫} = 10.9130$，$P = 0.0004$；$t_{幼虫} = 12.5205$，$P = 0.0002$），而且雌成虫 *AsHO*-1 基因表达水平显著低于雄成虫和幼虫（$F_{中肠} = 12.939$，$P = 0.0067$；$F_{中肠外组织} = 16.476$，$P = 0.0037$）（图 4）。

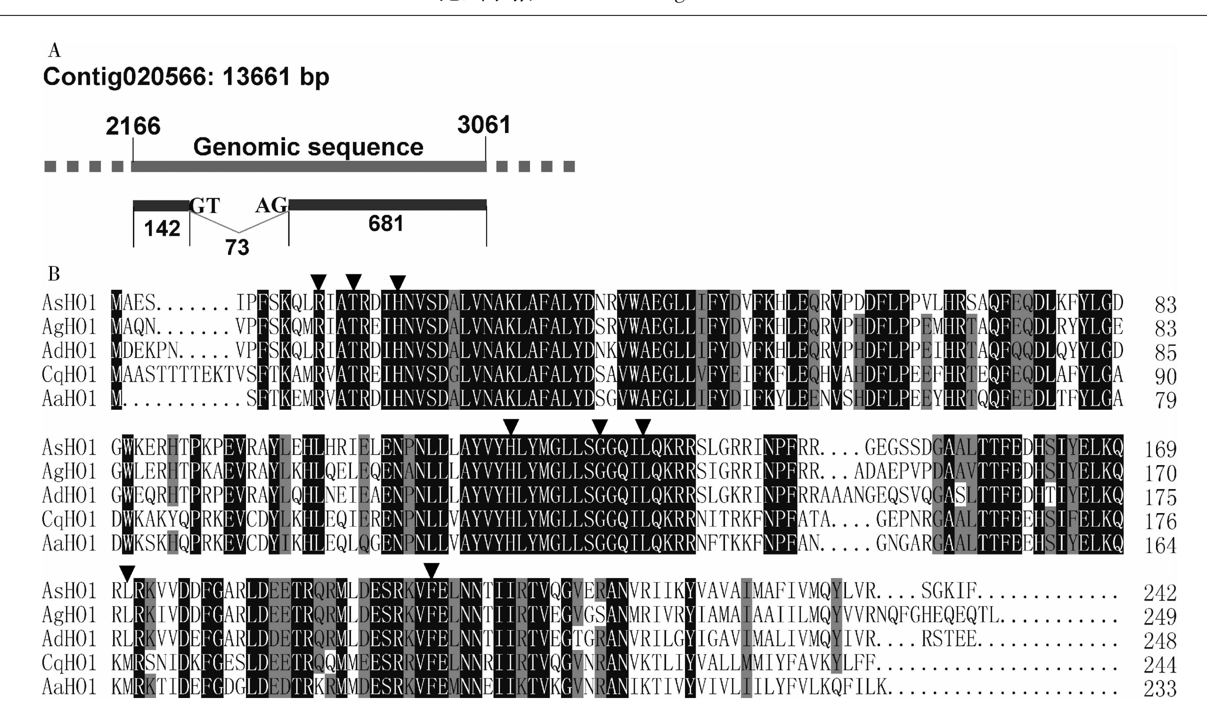


图 1 中华按蚊 *AsHO*-1 的基因结构(A)及 AsHO-1 与部分蚊虫 HO-1 的氨基酸序列比对(B)

Fig. 1 Gene structure of *AsHO*-1 (A) and multiple alignments of amino acid sequences of AsHO-1 with HO-1 of other mosquitoes (B)

黑色三角形指示形成疏水性口袋中的关键氨基酸残基 Black triangles indicate the key amino acid residues that form the binding pocket. 蛋白质来源及 GenBank 登录号 Origin of HO-1 proteins and their GenBank accession numbers: AsHO1: 中华按蚊 *Anopheles sinensis*, KP994552; AdHO1: 达氏按蚊 *Anopheles darling*, ETN58590; CqHO1: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, XP_001848782; AgHO1: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, XP_318426; AaHO1: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XP_001658955.

2.4 *AsHO*-1 基因在中华按蚊吸食血液前后的表达

中华按蚊吸食血液后,*AsHO*-1 基因在中肠和中肠外组织中的表达水平均发生显著的变化($F_{中肠外组织}=86.16$, $P=0.0001$; $t_{中肠}=121.9130$, $P=0.0001$)(图 5)。中肠外组织中,*AsHO*-1 基因仅在吸食血液后 3 h 的表达水平上调了 2.78 倍($t_{UF-3h}=8.3930$, $P=0.0011$),其余时间点与吸血前的表达水平无显著差异;中肠中,*AsHO*-1 基因在 12 h 迅速上升,24 h 达到顶峰,随后迅速下降到吸血前的水平,12,18 和 24 h 分别上升了 13.65, 24.56 和 40.53倍(图 5)。

2.5 *AsHO*-1 基因在中华按蚊取食血液和葡萄糖前后的表达比较

单独取食葡萄糖或血液都能引起中肠中 *AsHO*-1 基因的表达水平发生改变($F_{葡萄糖}=19.563$, $P=0.0001$; $t_{血液}=184.002$, $P=0.0001$)(图 6)。取食葡萄糖后,*AsHO*-1 基因的表达水平在 6 h 和 12 h 分别上升了 4.2 倍和 3.34 倍,而 6 h 之前和 12 h 之后与吸食葡萄糖之前无明显差异;取食血液后,*AsHO*-1 基因的表达水平在 12 h 开始上升,24 h 达到最大值,最高上升了 11.67 倍,12 h 之前和 24 h 之后 *AsHO*-1 基因的表达水平与吸食血液之前无明显差异(图 6)。

3 讨论

吸血性昆虫吸血后,随着血液蛋白的消化,短时间内能够释放出大量的游离血红素(Paiva-Silva *et al.*, 2006)。血红素参与许多重要的生命过程,如氧运输、呼吸、光合作用、药物解毒以及信号转导等(Ponka, 1999),但过量的游离血红素是潜在的毒性分子,可以引起活性氧族的形成和细胞的裂解(Schmitt and Frezzati, 1993; Ryter and Tyrrell, 2000; Lima *et al.*, 2012)。为适应血液消化后高浓度的游离血红素带来的氧化压力,在进化过程中吸血性昆虫逐渐形成了复杂的自我保护机制,其中通过 HO 分解血红素是最普遍的应对血红素毒性的方式(Ortiz de Montellano and Wilks, 2000)。

HO 是血红素降解代谢过程中的起始酶和限速酶,在细菌、昆虫、藻类、植物和脊椎动物等生物中广

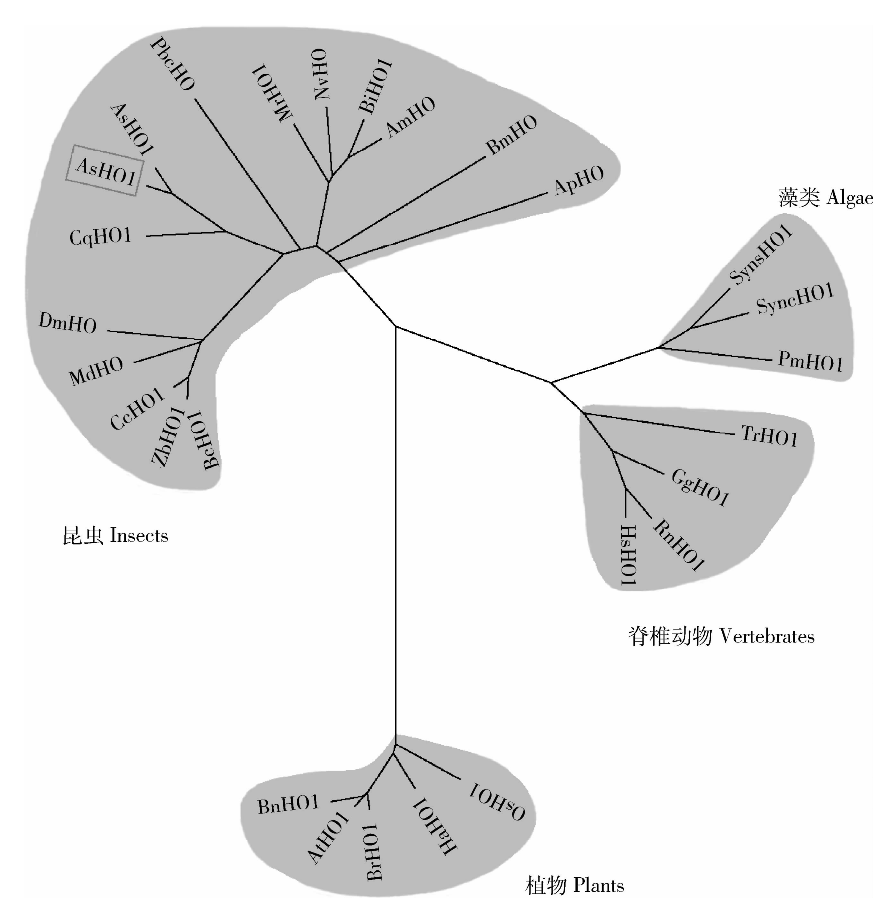


图 2　中华按蚊 AsHO-1 与其他物种 HO-1 氨基酸序列的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree based on amino acid sequences of HO-1 proteins from *Anopheles sinensis* and other species

HO-1 来源及 GenBank 登录号为 Origin of HO-1 proteins and their GenBank accession numbers：AsHO1：中华按蚊 *Anopheles sinensis*, KP994552；AdHO1：达氏按蚊 *Anopheles darling*, ETN58590；CqHO1：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, XP_001848782；MrHO1：苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata*, XP_003703646；BiHO1：熊蜂 *Bombus impatiens*, XP_003490927；NvHO：丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*, NP_001135857；AmHO：西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NP_001011641；CcHO1：地中海实蝇 *Ceratitis capitata*, XP_004536977；PhcHO：体虱 *Pediculus humanus corporis*, XP_002429049；DmHO：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_524321；BmHO：家蚕 *Bombyx mori*, NP_001040361；ApHO：碗豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* , NP_001156147；BcHO1：瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*, XP_011185566；ZnHO1：湿木白蚁 *Zootermopsis nevadensis*, KDR23962；MdHO：家蝇 *Musca domestica*, XP_011291398；SynsHO1：集胞藻 *Synechocystis* PCC6803, BA000022；SyncHO1：聚球藻 *Synechococcus* PCC7942, AF048758；PmHO1：原绿球藻 *Prochlorococcus marinus*, AY030299；TrHO1：红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*, AF022814；RnHO1：褐家鼠 *Rattus norvegicus*, NM_012580；HsHO1：人 *Homo sapiens*, NM_002133；GgHO1：鸡 *Gallus gallus*, P14791；HaHO1：向日葵 *Helianthus annuus*, KC508614；BrHO1：大白菜 *Brassica rapa*, HQ690823；AtHO1：拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, AB021858；BnHO1：欧洲油菜 *Brassica napus*, GU390397；OsHO1：水稻 *Oryza sativa*, EU781632.1.

泛存在。但有关 HO 基因的克隆、表达和功能研究主要集中于哺乳动物和一些植物，有关吸血性昆虫 HO 基因的报道较少。本研究通过分析中华按蚊的转录组数据（Chen *et al*., 2014），鉴定到一个全长的 HO 基因。该基因与达氏按蚊等昆虫的 *HO*-1 具有较高的同源性，具有保守的 HemeO 结构域（图 1），吸血后显著上调表达（图 5），表明鉴定出的基因为中华按蚊的 *HO*-1，命名为 *AsHO*-1。

血液蛋白主要在蚊虫的中肠消化，因此我们比较研究了 *AsHO*-1 基因在幼虫和成虫的中肠、中肠以外组织中的表达情况。组织表达分析发现 *AsHO*-1 在中华按蚊的幼虫和成虫中都有表达，但幼虫期的表达水平较成蚊高（图 3）。蚊虫幼虫不取食血液，没有短时间内高浓度游离血红素带来的氧化压力，因此 *AsHO*-1 基因在幼虫期的主要功能可能不是参与血红素的代谢，在幼虫期的功能还有待进一步研究。中肠外组织是指仅仅去掉中肠的整只蚊虫，*AsHO*-1 基因在中肠外组织中的表达水平显著高于中肠（图 3）。在哺乳动物中，*HO*-1 在大多数组织中都有表达，但表达水平较低，当受到伤害性刺激时可以诱导产生高水平的表达，在神经元、肝脏和脾脏中表达水平最高（Kukoba and Moĭbenko, 2002）。在中华按蚊中，*AsHO*-1 基因在中肠外组织中的表达分布和在中肠外组织中的功能还不清楚，有待进一步研究。

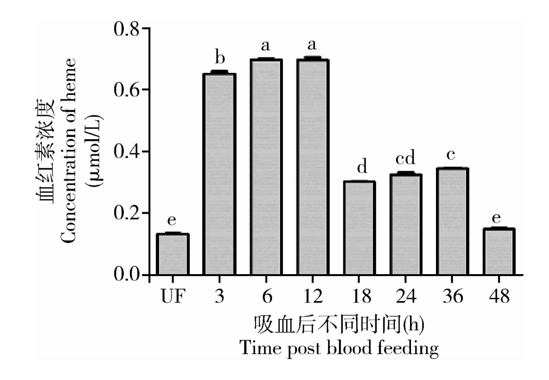


图 3 中华按蚊吸食血液后中肠中血红素的浓度变化

Fig. 3 Changes in heme concentration in the midgut of *Anopheles sinensis* post blood feeding

柱上不同字母表示中肠中血红素的浓度在吸血后不同时间的存在显著差异($P<0.01$)。Different letters above bars indicate significant difference in heme level at different time post blood feeding detected with ANOVA analysis ($P<0.01$).

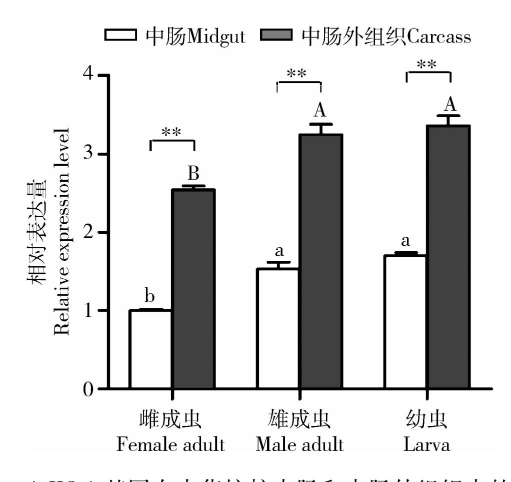


图 4 *AsHO*-1 基因在中华按蚊中肠和中肠外组织中的表达

Fig. 4 Expression of *AsHO*-1 in the midgut and other body tissues except midgut (carcass) of *Anopheles sinensis*

以 *Rps*7 基因作为内参;双星号表示差异极显著($P<0.01$),两组比较采用 Student's *t* 检验;柱上不同字母表示不同组织表达量存在显著差异($P<0.01$),采用单因素方差分析. *Rps*7 was used as the endogenous control. Double asterisks indicate extremely significant differences in expression level between two tissues detected with Student's *t*-test. Different letters above bars indicate significant difference in expression level among different tissues detected with ANOVA analysis ($P<0.01$).

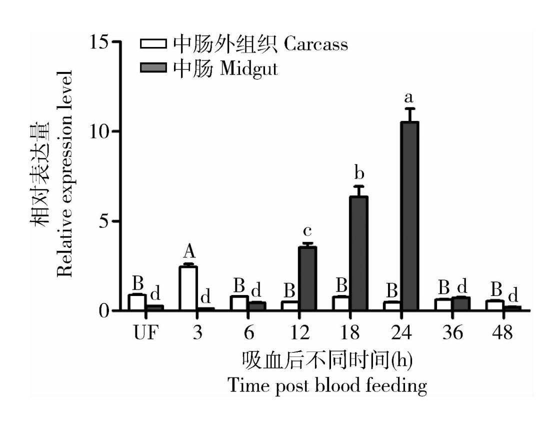


图 5 *AsHO*-1 基因在吸食血液前后的中华按蚊中肠和中肠外组织中的差异表达

Fig. 5 Differential expression of *AsHO*-1 between midgut and carcass of *Anopheles sinensis* mosquitoes at different time post blood feeding

UF: 未取食 Unfeeding. 以 *Rps*7 基因作为内参; 柱上不同字母表示 *AsHO*-1 基因在吸食血液后不同时间的表达量存在显著差异($P<0.01$)(单因素方差分析)。*Rps*7 was used as the endogenous control. Different letters above bars indicate significant difference in expression level at different time post blood feeding detected with ANOVA analysis ($P<0.05$).

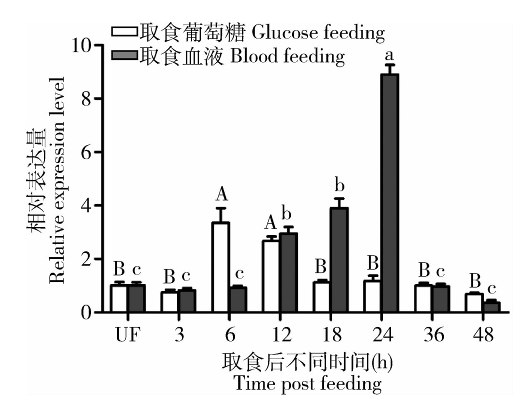


图 6 *AsHO*-1 基因在吸食血液和葡萄糖后的中华按蚊中的差异表达

Fig. 6 Differential expression of *AsHO*-1 between blood-feeding and glucose-feeding *Anopheles sinensis* mosquitoes at different time post feeding

UF: 未取食 Unfeeding. 以 *Rps*7 基因作为内参; 柱上不同字母表示 *AsHO*-1 基因在吸食血液或葡萄糖后不同时间的表达量存在显著差异($P<0.01$)(单因素方差分析)。*Rps*7 was used as the endogenous control. Different letters above bars indicate significant difference in expression level at different time post blood or glucose feeding detected with ANOVA analysis ($P<0.05$).

中华按蚊取食血液后血红素浓度的变化呈现出明显的 3 个阶段,3 - 12 h 浓度最高,18 - 36 h 浓度下降,48 h 恢复到吸血前的水平(图 3)。参与蚊虫血液蛋白消化的主要是内切蛋白酶,包括胰蛋白酶、凝乳蛋白酶、羧肽酶和氨肽酶(Isoe *et al*., 2009)。埃及伊蚊取食血液后,胰蛋白酶的表达呈现出双相表达的模式,早期表达的胰蛋白酶在 0 - 6 h 被诱导表达,晚期表达的胰蛋白酶在 12 - 24 h 表达,而羧肽酶在取食血液后的 3 - 36 h 被诱导表达(Felix *et al*., 1991; Noriega *et al*., 1996; Isoe *et al*., 2009)。冈比亚按蚊的凝乳蛋白酶在取食血液后的 12 - 48 h 表达(Vizioli *et al*., 2001)。中华按蚊中肠消化型蛋白酶在取食血液后的动态表达及其对血液蛋白的消

化过程还没有报道,但中华按蚊血红素的浓度在吸食血液后 3 h 就上升了 4.94 倍(图 3),说明中华按蚊的血液蛋白在取食血液后的 3 h 内就开始消化。

AsHO-1 基因的表达水平在吸血后的 12 h 开始上调表达,到 24 h 达到顶峰(图 5),而血红素的浓度在吸血后的 3 h 开始显著上升,但在 12 h 后开始下降(图 3)。由此可见,*AsHO*-1 的表达受到高浓度的血红素诱导。虽然 *AsHO*-1 在中肠外组织中也高水平表达(图 4),但吸食血液后中肠外组织中的 *AsHO*-1 表达水平仅在 3 h 上调 2.78 倍,随即恢复到吸血前的水平,并维持较为稳定的表达状态,而中肠中 *AsHO*-1 基因在 12, 18 和 24 h 分别上升了13.65, 24.56 和 40.53 倍(图5)。而且,取食葡萄糖后中肠中 *AsHO*-1 表达水平也仅在 6 - 12 h 上调表达,与吸血后上调表达的时间段不一致(图 6)。这些结果进一步说明,血餐后 *AsHO*-1 基因的表达水平显著上调,可能参与血红素的降解代谢以维持游离血红素的动态平衡。但还需要通过体外表达、代谢验证和 RNAi 等方法进一步研究 *AsHO*-1 基因在血红素代谢中的功能。

蚊虫中肠的围食膜可以将食团与肠道上皮细胞分隔开,起到保护作用,而且围食膜还能够结合游离的血红素(Pascoa *et al*., 2002; Devenport *et al*., 2006)。研究发现,埃及伊蚊在吸食血液后,游离的血红素被围食膜吸附,结合到围食膜上的血红素量随着埃及伊蚊血液消化的进行而增加,于血餐后 48 h达到最大值,此时围食膜中的血红素能达到 18 nmol/L,这与 2 μL 血液完全水解所释放的血红素的量相等,或与一次含血量为 3 μL 的血餐所释放的血红素量相近(Shahabuddin *et al*., 1995; Pascoa *et al*., 2002; Devenport *et al*., 2006)。本研究发现中华按蚊中肠中血红素的浓度在取食血液 12 h 后开始下降,一方面与 *AsHO*-1 基因的上调表达,血红素可能被 AsHO-1 代谢有关,另一方面与部分血红素是否有可能被中肠的围食膜结合有关,还有待进一步研究。

参考文献(References)

Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS, 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 35: 661 - 675.

Chen B, Zhang YJ, He ZB, Li WS, Si FL, Tang Y, He QY, Qiao L, Yan ZT, Fu WB, Che YF, 2014. *De novo* transcriptome sequencing and sequence analysis of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors*, 7: 314.

Cui L, Yoshioka Y, Suyari O, Kohno Y, Zhang X, Adachi Y, Ikehara S, Yoshida T, Yamaguchi M, Taketani S, 2008. Relevant expression of *Drosophila* heme oxygenase is necessary for the normal development of insect tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 377(4): 1156 - 1161.

Dansa-Petretski M, Ribeiro JMC, Atella GC, Masuda H, Oliveira PL, 1995. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J. Biol. Chem*., 270(18): 10893 - 10896.

Devenport M, Alvarenga PH, Shao L, Fujioka H, Bianconi ML, Oliveira PL, Jacobs-Lorena M, 2006. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. *Biochemistry*, 45: 9540 - 9549.

Felix CR, Betschart B, Billingsley PF, Freyvogel TA, 1991. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) is separable into two cellular phases. *Insect Biochem*., 21 (2): 197 - 203.

Fu GQ, Jin QJ, Lin YT, Feng JF, Nie L, Shen WB, Zheng TQ, 2011. Cloning and characterization of a heme oxygenase-2 gene from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Appl. Biochem. Biotechnol*., 165(5 - 6): 1253 - 1263.

Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GRC, Paes MC, Sorgine MHF, Oliveira MF, Oliveira PL, 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 36: 322 - 335.

Isoe J, Rascón AARJr, Kunz S, Miesfeld RL, 2009. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 39(12): 903 - 912.

Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M, 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 338: 558 - 567.

Kukoba TV, Moĭbenko OO, 2002. Heme oxygenase and carbon monoxide: the protection or the injury of cells? *Fiziol. Zh*., 48(5): 79 - 92.

Lara FA, Lins U, Bechara GH, Oliveira PL, 2005. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Exp. Biol*., 208: 3093 - 3101.

Lara FA, Lins U, Paiva-Silva G, Almeida IC, Braga CM, Miguens FC, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, 2003. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J. Exp. Biol*., 206: 1707 - 1715.

Lecube ML, Noriega GO, Santa Cruz DM, Tomaro ML, Batlle A, Balestrasse KB, 2004. Indole acetic acid is responsible for protection against oxidative stress caused by drought in soybean plants: the role of heme oxygenase induction. *Redox Report*, 19 (6): 242 - 250.

Liao YF, Zhu W, Li DP, Zhu X, 2013. Heme oxygenase-1 and gut ischemia/reperfusion injury: a short review. *World J. Gastroenterol*., 19(23): 3555 - 3561.

Lima VLA, Dias F, Nunes RD, Pereira LO, Santos TSR, Chiarini LB, Ramos TD, Silva-Mendes BJ, Perales J, Valente RH, Oliveira PL, 2012. The antioxidant role of xanthurenic acid in the *Aedes aegypti* midgut during digestion of a blood meal. *PLoS ONE*, 7(6): e38349.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Maya-Monteiro CM, Daffre S, Logullo C, Lara FA, Alves EW, Capurro ML, Zingali R, Almeida IC, Oliveira PL, 2000. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.*, 275: 36584 – 36589.

McCoubrey WKJr, Huang TJ, Maines MD, 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.*, 247: 725 – 732.

Noriega FG, Pennington JE, Barillas-Mury C, Wang XY, Wells MA, 1996. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. *Insect Mol. Biol.*, 5: 25 – 29.

Oliveira MF, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Souza W, Lins U, Braga CMS, Masuda H, Oliveira PL, 1999. Haem detoxification by an insect. *Nature*, 400: 517 – 518.

Oliveira MF, Timm BL, Machado EA, Miranda K, Attias M, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Oliveira MA, de Souza W, Pinhal NM, Sousa JJF, Vugman NV, Oliveira PL, 2002. On the pro-oxidant effects of haemozoin. *FEBS Lett.*, 512(1 – 3): 139 – 144.

Ortiz de Montellano PR, Wilks A, 2000. Heme oxygenase: structure and mechanism. *Adv. Inorg. Chem.*, 51: 359 – 407.

Paes MC, Oliveira MB, Oliveira PL, 2001. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the bloodsucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 48: 63 – 71.

Paiva-Silva GO, Cruz-Oliveira C, Nakayasu ES, Maya-Monteiro CM, Dunkov BC, Masuda H, Almeida IC, Oliveira PL, 2006. A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(21): 8030 – 8035.

Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena M, Lemos FJA, 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 517 – 523.

Pereira LOR, Oliveira PL, Almeida IC, Paiva-Silva GO, 2007. Biglutaminyl-biliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes aegypti*. *Biochemistry*, 46: 6822 – 6829.

Ponka P, 1999. Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.*, 318: 241 – 256.

Qin Z, Ran YH, Zhi ZJ, Yan ZT, Zhang YJ, Huang T, He ZB, Chen B, 2014. Cloning and expression analysis of an odorant binding protein gene *AsinOBP1* from *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(11): 1289 – 1298. [秦赠, 冉永红, 支中婧, 闫振天, 张玉娟, 黄婷, 何正波, 陈斌, 2014. 中华按蚊气味结合蛋白基因 *AsinOBP1* 的克隆和表达分析. 昆虫学报, 57(11): 1289 – 1298]

Richaud C, Zabulon G, 1997. The heme oxygenase gene (*pbsA*) in the red alga *Rhodella violacea* is discontinuous and transcriptionally activated during iron limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11736 – 11741.

Ryter SW, Tyrrell RM, 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biol. Med.*, 28: 289 – 309.

Schmitt TH, Frezzatti WAJr, Schreier S, 1993. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 307: 96 – 103.

Shahabuddin M, Kaidoh T, Aikawa M, Kaslow DC, 1995. *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Exp. Parasit.*, 81: 386 – 393.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876 – 4882.

Vizioli J, Catteruccia F, della Torre A, Reckmann I, Muller HM, 2001. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *Eur. J. Biochem.*, 268: 4027 – 4035.

Xie Y, Mao Y, Xu S, Zhou H, Duan X, Cui W, Zhang J, Xu G, 2015. Heme-heme oxygenase 1 system is involved in ammonium tolerance by regulating antioxidant defence in *Oryza sativa*. *Plant Cell Environ.*, 38(1): 129 – 143.

Zhang X, Sato M, Sasahara M, Migita CT, Yoshida T, 2004. Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied. *Eur. J. Biochem.*, 271(9): 1713 – 1724.

Zhou D, Zhang D, Ding G, Shi L, Hou Q, Ye Y, Xu Y, Zhou H, Xiong C, Li S, Yu J, Hong S, Yu X, Zou P, Chen C, Chang X, Wang W, Lv Y, Sun Y, Ma L, Shen B, Zhu C, 2014. Genome sequence of *Anopheles sinensis* provides insight into genetics basis of mosquito competence for malaria parasites. *BMC Genomics*, 15(1): 42.

Zhou G, Flowers M, Friedrich K, Horton J, Pennington J, Wells MA, 2004. Metabolic fate of [^{14}C]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.*, 50(4): 337 – 349.

(责任编辑: 袁德成)